



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/20672
C12N 15/86, C07K 16/28, C12N 7/01, 5/10, 15/13		(43) Date de publication internationale: 3 août 1995 (03.08.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00110		(74) Mandataires: ORES, Irène etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).
(22) Date de dépôt international: 31 janvier 1995 (31.01.95)		
(30) Données relatives à la priorité: 94/01015 31 janvier 1994 (31.01.94) FR		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PROTEINE PERFORMANCE [FR/FR]; Route d'Alès, F-30380 Saint-Christol-lès-Alès (FR).		
(72) Inventeurs; et		Publiée
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CERUTTI, Martine [FR/FR]; 2997, route de Montèze, F-30380 Saint-Christol-lès-Alès (FR). CHAABIHI, Hassan [MA/FR]; 30B, avenue Jules-Guesde, F-30100 Alès (FR). DEVAUCHELLE, Gérard [FR/FR]; 137, chemin de l'Espervette, F-30380 Saint-Christol-lès-Alès (FR). GAUTHIER, Laurent [FR/FR]; 186, grande-rue, F-30100 Alès (FR). KAC-ZOREK, Michel [FR/FR]; 81, boulevard de la Lironde, F-34980 Montferrier (FR). LEFRANC, Marie-Paule [FR/FR]; 4, rue du Vallon, F-34830 Clapiers (FR). POUL, Marie-Alix [FR/FR]; 10, rue de Docteur-Roux, F-34000 Montpellier (FR).		Avec rapport de recherche internationale.
(54) Title: RECOMBINANT BACULOVIRUS AND USE THEREOF IN THE PRODUCTION OF MONOClonAL ANTIBODIES		
(54) Titre: BACULOVIRUS RECOMBINANT ET SON UTILISATION POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONaux		
(57) Abstract		
<p>Recombinant baculovirus used as an expression vector in the production of immunoglobulins within an insect cell. The invention is characterized by an expression cassette comprising a sequence coding for at least one portion of an immunoglobulin H chain, said sequence being transcriptionally controlled by a first baculovirus promotor, and an expression cassette comprising a sequence coding for at least one portion of an immunoglobulin L chain, said sequence being transcriptionally controlled by a second baculovirus promotor. The first and second promotors are two different promotors or derivatives of different promotors, the first and second promotors residing in different loci.</p>		
<p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention est relative à un baculovirus recombinant, constituant un vecteur d'expression utilisable pour la production d'immunoglobulines dans une cellule d'insecte, et caractérisé en ce qu'il comprend: une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne H d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur de baculovirus; et une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne L d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur de baculovirus; le premier et le second promoteurs étant deux promoteurs différents ou des dérivés de promoteurs différents et le premier et le second promoteurs étant situés dans des locus différents.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

BACULOVIRUS RECOMBINANT ET SON UTILISATION POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX.

La présente Invention est relative à un baculovirus modifié et à son utilisation pour la production d'immunoglobulines.

Les anticorps ou immunoglobulines sont produits par les lymphocytes B. Chaque lymphocyte B sécrète un seul type d'anticorps. Chaque molécule d'immunoglobuline est constituée de l'association de deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée d'une partie variable (VH et VL) qui possède le site de fixation à l'antigène et d'une partie constante (CH et CL). Il existe plusieurs types de chaînes lourdes (γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , α , ϵ , μ) qui définissent les différentes classes d'immunoglobulines (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM...) et deux types de chaînes légères : (chaîne kappa (κ) et chaîne lambda (λ)). Par exemple les anticorps de classe IgG1 sont constitués de deux chaînes lourdes de type γ_1 et de deux chaînes légères κ ou lambda λ . Les parties variables sont le support de la spécificité de l'anticorps pour son antigène.

Pour chaque chaîne d'un anticorps donné, la région variable est constituée de plusieurs domaines dont certains sont plus ou moins conservés. Le réarrangement de ces régions variables est le fruit d'une recombinaison au niveau de l'ADN génomique des lymphocytes B.

Les anticorps monoclonaux sont classiquement produits à partir de cultures de lignées d'hybridomes, chaque lignée, dérivée d'un seul lymphocyte B, sécrétant un seul type d'immunoglobuline.

Les anticorps monoclonaux (MAbs) sont utilisés couramment aujourd'hui pour le diagnostic in vitro, et leur utilisation en thérapie et pour le diagnostic in vivo connaît un développement prometteur. Ce développement est toutefois freiné par le fait que les

seuls anticorps monoclonaux dont on puisse disposer relativement facilement et en quantité suffisante à partir des cultures d'hybridomes sont des anticorps monoclonaux de rongeurs. Or, les immunoglobulines de 5 rongeurs (et de manière générale les immunoglobulines non-humaines) induisent chez l'homme une réponse immunitaire indésirable, ce qui limite considérablement leur intérêt thérapeutique.

De nombreuses recherches ont été effectuées 10 dans le but d'obtenir des immunoglobulines ne possédant pas cet inconvénient ; il a en particulier été proposé de fabriquer par génie génétique des anticorps recombinants, dans lesquelles la plus grande partie possible de la molécule est dérivée d'un gène d'origine humaine.

15 Les anticorps obtenus, dans lesquels seuls les domaines variables sont d'origine non-humaine, sont dénommés anticorps chimériques. Il existe également des anticorps dits humanisés, dont les séquences des régions variables non directement impliquées dans la 20 reconnaissance de l'antigène ont été remplacées par des séquences d'origine humaine. Dans les deux cas, la majeure partie de la molécule d'immunoglobuline est dérivée d'un gène d'origine humaine.

L'obtention d'anticorps par génie génétique 25 nécessite toutefois le choix d'un hôte d'expression approprié, assurant les modifications post-traductionnelles nécessaires pour reproduire les propriétés de l'anticorps natif. Dans ce but il a été proposé, entre autres, d'utiliser le système 30 baculovirus/cellules d'insectes.

Les baculovirus sont utilisés couramment comme vecteurs pour l'expression de gènes hétérologues, placés sous contrôle des promoteurs viraux, dans des cellules d'insectes infectées. Le promoteur de la 35 polyédrine ou bien celui de la p10 (protéines produites en grande quantité pendant la phase très tardive du cycle

de réplication viral) sont ainsi fréquemment utilisés dans ce but.

HASEMAN et CAPRA [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3942-3946 (1990)], PUTLITZ et al. [Bio/Technology, 8, 5 651-654, (1990)], REIS et al. [Bio/Technology, 10, 910-912, (1992)] ont ainsi construit des baculovirus dans lesquels étaient insérées en un même locus, deux copies du promoteur de la polyédrine, l'une de ces copies contrôlant l'expression d'un gène codant pour la chaîne lourde d'une immunoglobuline de souris, l'autre contrôlant l'expression d'un gène codant pour la chaîne légère de la même immunoglobuline. Les cellules d'insectes infectées par ces baculovirus ont sécrété des immunoglobulines possédant sensiblement les mêmes propriétés que les anticorps d'origine lymphocytaire, qui ont servi de modèle. Cependant, la structure des baculovirus modifiés de la sorte ne se maintient pas au-delà de quelques cycles de réplication virale.

La présente Invention a pour but de produire à 20 la fois la chaîne lourde (H) et la chaîne légère (L) d'un anticorps donné dans une cellule d'insecte, en utilisant un vecteur d'expression dérivé d'un baculovirus, ne présentant pas les inconvénients des vecteurs d'expression du même type utilisés dans l'art antérieur 25 pour la production d'immunoglobulines.

Dans ce but les Inventeurs ont construit des baculovirus double-recombinant dans lesquels les séquences codantes des deux chaînes H et L sont situées à des locus différents du génome dudit baculovirus, et 30 chacune est placée sous le contrôle d'un promoteur fort différent, (contrairement aux baculovirus de l'art antérieur cité ci-dessus, où les deux chaînes sont placées dans un même locus du génome d'un baculovirus, et sous contrôle de deux copies du même promoteur).

La présente Invention a pour objet un baculovirus recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne H d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur de baculovirus, et ;
 - une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne L d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur de baculovirus ;
- le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents, et étant situés dans deux locus différents.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention, le premier et le second promoteur sont des promoteurs forts.

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente Invention, l'un des promoteurs est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la polyédrine et l'autre est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la P10.

On entend par : "promoteur de baculovirus" tout promoteur qui peut être intégré dans le génome d'un baculovirus, et fonctionner en cellules d'insectes ; un tel promoteur est dit "fort" lorsqu'il permet d'obtenir un niveau de transcription élevé (par exemple, de l'ordre de celui obtenu avec les promoteurs de la polyédrine ou de P10) d'un gène placé sous son contrôle.

Cette définition englobe non seulement les promoteurs de type "sauvage" tels que les promoteurs de la polyédrine et de P10 des baculovirus AcMNPV ou SlMNPV, mais également les dérivés de promoteurs, résultant de modifications plus ou moins importantes de la séquence

d'un promoteur "sauvage" de baculovirus, et en particulier les promoteurs synthétiques ou recombinants, tels que par exemple le promoteur synthétique décrit par WANG et al, [Gene, 100, 131-137, (1991)].

5 Selon un mode de réalisation préféré d'un baculovirus recombinant conforme à la présente Invention, au moins l'un des promoteurs mis en oeuvre est choisi dans le groupe constitué par :

- le promoteur de la polyédrine ;
- 10 - le promoteur de la p10 ;
- un nouveau promoteur synthétique, dénommé ci-après promoteur Syn, et constitué par un fragment d'ADN double brin dont la séquence est la suivante :
5- ATCAAATAAAATAAGTATTTAAAGAATTTCGTACGTATTTGTATATTAAATTAAAATACTATACTGTAAATAGATCG
15 TAGTTTATTATTATTCTAAAGCATGCATAAAACATATAATTAAATTATGATATGACATTATCTAGCTAG
3- 5-

La séquence du brin (+) de ce fragment est identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le 20 numéro SEQ ID NO : 1

La séquence du brin (-) de ce fragment est identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 2

L'utilisation du promoteur Syn permet 25 d'augmenter de manière très significative la production d'anticorps recombinants.

Le promoteur Syn, en tant que tel, fait également partie de l'objet de la présente invention.

Les promoteurs P10, polyédrine, et Syn peuvent 30 être associés 2 à 2 selon n'importe quelle combinaison ; en particulier, le promoteur Syn peut être associé avec avec le promoteur de la polyédrine, ou bien, avantageusement, avec celui de la protéine P10.

Selon un autre mode de réalisation préféré de 35 la présente Invention, chaque cassette d'expression comprend : (i) un promoteur fort de baculovirus, tel que défini ci-dessus ; (ii) une séquence codant pour un

peptide-signal ; (iii) une séquence codant pour un domaine variable d'une chaîne H ou L d'immunoglobuline ; (iv) une séquence codant pour au moins une partie d'un domaine constant d'une chaîne H ou L d'immunoglobuline.

5 Un tel baculovirus recombinant constitue un vecteur d'expression directement utilisable pour la production d'immunoglobulines dans une cellule d'insecte.

De préférence, la séquence codant pour le peptide-signal qui est placée sous contrôle du premier 10 promoteur et la séquence codant pour le peptide-signal qui est placée sous contrôle du second promoteur sont deux séquences différentes.

Des séquences connues en elles-mêmes, codant pour des peptides signal fonctionnels en cellules 15 d'insecte sont utilisables pour la mise en oeuvre de la présente Invention. A titre d'exemples non limitatifs, on citera des séquences codant pour les peptides signal de l'acétylcholinestérase de Drosophile, de la trophoblastine ovine, de la lactotransferrine bovine, des 20 chaines H et L d'immuno-globulines, etc...

Les Inventeurs ont toutefois constaté qu'il était préférable, pour obtenir la meilleure sécrétion de la molécule d'immunoglobuline, que la séquence His-Val-Ser soit présente immédiatement en amont du site de 25 coupure utilisé par la signal-peptidase.

Les séquences codant pour les domaines constants et variables peuvent être de même origine, ou d'origine différente ; il peut s'agir également de séquences synthétiques ou recombinantes. Avantageusement, 30 la séquence codant pour le domaine constant est d'origine humaine ; la séquence codant pour le domaine variable peut être d'origine totalement humaine ou au moins partiellement non-humaine, par exemple d'origine murine, etc

La présente Invention englobe les cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant conforme à l'invention.

L'infection des cellules par un baculovirus double-recombinant conforme à l'Invention résulte dans la production des chaînes H et L. Ces chaînes s'assemblent pour reconstituer l'anticorps monoclonal désiré qui est par la suite sécrété dans le milieu de culture.

La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'une immunoglobuline, caractérisé en ce que l'on met en culture des cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant conforme à l'invention, et en ce que l'on extrait ladite immunoglobuline du milieu de culture.

La présente Invention englobe également les immunoglobulines susceptibles d'être obtenues par le procédé ci-dessus.

La présente Invention a en outre pour objet un procédé de préparation d'un baculovirus recombinant, lequel procédé est caractérisé en ce que :

- l'on prépare un premier plasmide de transfert comprenant une séquence codant pour au moins une partie de chaîne H d'immunoglobuline, sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur fort d'un baculovirus ;

- l'on prépare un second plasmide de transfert comprenant une séquence codant pour au moins une partie de chaîne L d'immunoglobuline, sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur fort de baculovirus ;

le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents ;

et l'on procède à la recombinaison homologue de l'un et de l'autre desdits plasmides avec l'ADN d'un baculovirus.

La construction d'un baculovirus recombinant conforme à l'Invention se fait en utilisant les techniques classiques de clonage de gènes hétérologues chez les baculovirus.

5 Schématiquement, la construction des plasmides de transfert se fait en insérant dans un plasmide capable de se répliquer chez un hôte bactérien (en général *E. coli*), la région du gène de baculovirus (par exemple p10 ou polyédrine) à la place duquel on souhaite insérer les
10 gènes codant pour les chaînes H ou L d'immunoglobuline. Dans cette région, la séquence codante du gène de baculovirus (et éventuellement la séquence promoteur dudit gène) est remplacée par la séquence codant pour la chaîne d'immunoglobuline à exprimer (et éventuellement
15 par la séquence du promoteur sous contrôle duquel on souhaite exprimer cette chaîne d'immunoglobuline, s'il s'agit par exemple d'un promoteur "dérivé"). Le plasmide de transfert ainsi obtenu contient donc un insert comprenant une séquence hétérologue flanquée de séquences
20 de baculovirus. On cotransferte ensuite les cellules d'insecte avec l'ADN du vecteur de transfert ainsi réalisé et l'ADN du baculovirus, ce qui par recombinaison homologue entre l'ADN viral et les séquences de baculovirus flanquant la séquence hétérologue dans le
25 plasmide, permet le transfert de la séquence étrangère du plasmide vers le génome viral.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à la présente Invention, les plasmides de transfert utilisés portent un insert comprenant une cassette d'expression telle que définie ci-dessus, et de part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant la portion du génome viral en remplacement de laquelle on souhaite insérer ladite cassette.

35 Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, lesdites séquences de baculovirus sont

homologues de celles des régions flanquant le gène de la p10, ou homologues de celles des régions flanquant le gène de la polyédrine.

Après réplication de l'ADN viral dans les 5 cellules transfectées, l'on procède à la sélection des baculovirus recombinants ayant intégré les séquences hétérologues.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux du procédé conforme à l'invention, l'ADN de 10 baculovirus avec lequel est effectuée la recombinaison homologue des plasmides de transfert est constitué par l'ADN d'un baculovirus préalablement modifié par insertion de deux sites Bsu36I de part et d'autre de la 15 séquence codant pour la protéine P10 (ces deux sites étant les seuls pour l'enzyme concernée dans le génome dudit baculovirus modifié), et digéré par l'enzyme Bsu36I.

Le baculovirus dans lequel sont insérés les 20 sites Bsu36I peut être un baculovirus sauvage, ou un baculovirus déjà modifié, par exemple le virus dénommé AcD3, modifié par délétion du gène et du promoteur polyédrine, à condition toutefois que ce baculovirus conserve les régions flanquantes de la polyédrine et de la P10.

25 Lors de la mise en présence des fragments d'ADN résultant de la digestion Bsu36I avec les deux vecteurs de transfert (par co-transfection), seuls parmi ces fragments d'ADN, ceux qui recombinent avec le vecteur portant les régions flanquantes de la P10 reconstituent 30 un génome viral circulaire, et permettent d'obtenir des virus viables.

Parmi les virus obtenus, seuls ceux qui ont 35 également recombiné avec le vecteur portant les régions flanquantes de la polyédrine permettent l'expression des deux chaînes d'immunoglobuline, ils peuvent donc être sélectionnés en détectant l'immunoglobuline produite (par

exemple par ELISA). En outre, dans le cas où le virus de départ comprend le gène de la polyédrine, seuls les virus qui ont recombiné avec le vecteur portant les régions flanquantes de la polyédrine sont dépourvus de ce gène et peuvent être sélectionnés sur la base de leur phénotype ob- (absence de polyèdres).

Ce procédé permet donc d'obtenir, en une seule étape, en procédant à une triple transfection, les vecteurs ayant intégré les chaînes lourdes et les chaînes légères.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation de baculovirus recombinants conformes à l'invention, et à leur utilisation pour la production d'immunoglobulines dans des cellules d'insectes.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1. : Construction d'une cassette chaîne légère Kappa, (pBCK) (Figure 1) :

a- Plasmide pGmAc116T :

Ce vecteur de transfert est dérivé du plasmide pGmAc115T [ROYER et al., J. Virol., 66, 3230-3235, (1992)], lui-même dérivé du plasmide pAc1 [CHAABIHI et al., J. Virol., 67, 2664-2671 (1993)] contenant le fragment EcoRI-I du baculovirus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* (AcMNPV), et donc le gène polyédrine, et les séquences flanquant ledit gène. Pour obtenir pGmAc116T, le plasmide pGmAc115T a été délétré d'un fragment de 1900pb allant d'un site EcoRI situé en amont du gène polyédrine à un site XhoI situé 1900pb en aval de ce site EcoRI. La délétion a été effectuée par coupure exhaustive XhoI, suivie d'une coupure partielle par EcoRI. 5 µg du plasmide pGm115T ont

étété digérés pendant 2 heures à 37°C par 15 unités d'enzyme XhoI (Boehringer), dans un volume réactionnel de 50 µl et dans les conditions préconisées par le fournisseur. L'enzyme a été éliminée par une extraction 5 au phénol/chloroforme et l'ADN plasmidique a été précipité à l'alcool. Cet ADN a été ensuite partiellement coupé par EcoRI (Boehringer) dans un volume réactionnel de 50 µl en présence de 0,5 unité d'enzyme. L'incubation a été faite à 37°C pendant 20 minutes. Après une nouvelle 10 extraction au phénol/chloroforme, les extrémités générées par les coupures XhoI et EcoRI ont été rendues franches par l'enzyme de Klenow (Biolabs) en présence des 4 dNTPs selon le protocole préconisé par le fournisseur. L'ADN plasmidique a enfin été précipité à l'alcool et incubé 15 avec la ligase du phage T4 (Boehringer) dans les conditions préconisées. Des bactéries *E. coli* compétentes ont été transformées par une partie du mélange de ligation, le criblage des colonies issues de cette transformation a permis de sélectionner le plasmide 20 pGmAc116T.

b- Les promoteurs :

Le promoteur p10 ou le promoteur polyédrine du virus de la polyédrose nucléaire de *Spodoptera littoralis* (SlMNPV) sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces 25 permettant de reconstituer un site EcoRV en amont du promoteur, et un site BglII en aval. Le produit d'amplification est digéré par EcoRV et BglII, et les fragments portant les séquences promotrices sont insérés dans pGmAc116T préalablement digéré par ces mêmes enzymes. La digestion par EcoRV et BglII permet 30 d'éliminer le promoteur polyédrine de AcMNPV, et de le remplacer par l'un des deux promoteurs cités plus haut.

Les plasmides obtenus sont respectivement appelés pGmAc10 (promoteur de la p10), ou pGmAc33 35 (promoteur de la polyédrine).

Le promoteur synthétique a été produit par synthèse chimique sous forme des deux oligonucléotides complémentaires SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 2.

Une fois appariés, ces oligonucléotides reconstituent un
5 ADN double brin directement utilisable dans une réaction de ligation.

Le plasmide pGmAc116T a été digéré par EcoRV et BglII pour éliminer le promoteur polyédrine de AcMNPV, et la séquence du promoteur synthétique a été insérée en
10 remplacement. Le plasmide obtenu est appelé pGmAcSyn.

c- Peptide-signal :

La séquence codante choisie pour le peptide-signal est la suivante :

5' - ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA
15 GCT ACA GGT GTC CAC TCC -3'

Cette séquence a été choisie à partir des séquences publiées par [NEUBERGER M.S., EMBO J, vol. 2, p. 1373-1378 (1983)].

Elle est identifiée dans la liste des
20 séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 3

Cette séquence a été synthétisée chimiquement sous forme de deux oligonucléotides complémentaires ayant des extrémités permettant l'insertion du duplex dans un site BglII. A l'une des extrémités du duplex, il y a une
25 séquence correspondant à celle du début de la "charpente 1" (framework 1) des chaînes légères (avec le site SacI), suivie d'une séquence portant un site XhoI. Pour l'appariement, 15 µg de chacun des deux oligonucléotides sont incubés dans 50 µl de tampon (Tris 1 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM), pendant 5 minutes dans un bain marie à 70°C. Le bain est ensuite laissé refroidir jusqu'à température ambiante (22 à 25°C). Le mélange est utilisé directement dans les réactions de ligation avec les plasmides pGmAc10, pGmAc33, ou le plasmide pGmAcSyn préalablement
30 coupés par BglII.
35

Les conditions de ligation sont les suivantes :

1 μ g du plasmide pGmAc choisi, coupé par BglII, 1 μ g de l'oligonucléotide bicaténaire portant la séquence codant pour le peptide-signal, 2 μ l de tampon ligase 10X (BOEHRINGER), eau distillée q.s.p. 19 μ l, 1 unité (1 μ l) de ligase (BOEHRINGER) ; l'incubation est effectuée à 22°C pendant 2 heures ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

10 d- Région constante :

La séquence codante de la région constante de la chaîne légère κ humaine a été amplifiée par PCR en utilisant comme matrice de l'ADNC de lymphocytes B humains. Les lymphocytes humains (environ 5x10⁸) ont été préparés à partir de 200 ml de sang en utilisant HISTOPAQUE® (SIGMA). L'ARN total a été extrait de ces lymphocytes en utilisant un kit PHARMACIA (RNA extraction kit). Le premier brin d'ADNC a été préparé à partir de l'ARN total à l'aide du kit "First-Strand cDNA synthesis kit" de PHARMACIA.

Les amorces utilisées pour amplifier le cDNA C κ sont les suivantes :

* HuC κ BAC :

5'-AGCTC GAG ATC AAA CGG-3'

25 (le site XhoI est souligné).

Cette amorce correspond à une séquence consensus en 3' des séquences codant pour les domaines variables des chaînes légères d'immunoglobulines humaines (J κ), et contient un site de coupure par XhoI.

30 Elle est identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 4

* HuC κ FOR :

5'-GAA GAT CTA ACA CTC TCC GCG GTT GAA G-3'

(le site BglII est souligné).

Cette amorce est complémentaire de l'extrémité 3' des gènes CK humains et apporte un site BglII en aval du codon stop TAG.

Elle est identifiée dans la liste des 5 séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 5

L'amplification avec les amorces HuCKBAC et HuCKFOR a permis d'obtenir un fragment d'environ 340 pb contenant la totalité de la région CK encadrée des sites XhoI et BglII.

10 Le produit de l'amplification a été digéré par BglII et XhoI avant d'être cloné dans les sites XhoI-BglII des plasmides pGmAc portant la séquence codant pour le peptide-signal, pour donner les plasmides pBCK.

15 La composition du mélange de ligation est la suivante :

1 μ g du plasmide pGmAc coupé par XhoI et BglII ; 200 ng du fragment CK amplifié et digéré par BglII et XhoI, 2 μ l de tampon ligase 10X (BOEHRINGER), eau distillée q.s.p. 19 μ l, 1 unité (1 μ l) de ligase 20 (BOEHRINGER).

L'incubation est effectuée à 22°C pendant 2 heures ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

25 **Exemple 2 - Cassette chaîne légère Lambda (pBC λ) (figure 2) :**

a. Région constante C λ :

30 Comme pour la séquence codante de la région constante CK, la séquence codante C λ a été obtenue par amplification par PCR de l'ADN complémentaire des ARN messagers de lymphocytes B humains.

35 L'amplification par PCR de la région C λ a été réalisée en présence de l'amorce OPP-HuC λ 3' complémentaire de l'extrémité 3' des régions C λ et apportant le site de restriction BglII et de l'amorce OPP-HuC λ 5' complémentaire de l'extrémité 5' des régions C λ et apportant le site de restriction XhoI.

Les séquences des deux amorces sont les suivantes :

*OPP-HuC λ 3' :

5'-CCT GTC AGA TCT ATG AAC ATT CTG TAG GGG-3'

5 (site BglIII souligné)

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 6

*OPP-HuC λ 5' :

5'-CCG CCC TCC CTC GAG CTT CAA-3'

10 (site XhoI souligné)

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 7

Après coupure par les enzymes BglIII et XhoI, la séquence C λ amplifiée est insérée entre les sites XhoI et BglII du plasmide pBCK, préalablement délétré du gène CK par traitement par les enzymes BglIII et XhoI et purification du fragment plasmidique de 7,8 kb.

Le plasmide obtenu est dénommé pBC λ .

L'insertion de la région constante λ ambda a été vérifiée par séquençage du plasmide pBC λ en présence des deux amorces OPP-HuC λ 3' et OPP-HuC λ 5'.

La cassette chaîne lambda (C λ) est destinée au clonage des parties variables de chaînes légères de type lambda.

25 Ces parties variables sont amplifiées par PCR en utilisant d'une part une amorce (OPP-HuV λ 5') qui hybride au niveau de la charpente 1 des chaînes légères et qui permet de reconstituer un site SacI, et d'autre part une amorce (OPP-HuV λ 3') qui est quasiment complémentaire de l'amorce OPP-HuC λ 5' et qui permet de reconstituer un site XhoI.

Les séquences de ces amorces sont les suivantes :

*OPP-HuV λ 5' :

35 5'-CA(GC)TCTGAGCTCAC(GT)CAG-3'

(site SacI souligné)

qui est identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 8

* OPP-HuVλ3' :

5'-TTG AAG CTC CTC GAG GGA GGG CGG GAA-3'

5 (site XhoI souligné)

qui est identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 9

**Exemple 3 - Cassette chaîne lourde γ1 (pBCγ1)
(figure 3) :**

10 a- Plasmide de transfert :

Le plasmide pGm16 [BLANC et al, Virology, 192, 651-654, (1993)] dérive d'un plasmide dans lequel a été cloné le fragment EcoRI-P du baculovirus AcMNPV contenant le gène p10. La quasi-totalité de la séquence codante a été déletée et remplacée par un site BglII permettant l'insertion de séquences à exprimer sous le contrôle du promoteur p10.

b- Le peptide-signal :

20 La séquence codante du peptide-signal pour la sécrétion de la chaîne lourde est une séquence artificielle, qui code pour un peptide ayant deux caractéristiques favorisant la sécrétion : hydrophobicité globale (cette caractéristique est commune à tous les peptides-signal), et présence de la séquence Val-His-Ser
25 en amont du site de coupure par la "Signal-Peptidase".

La séquence codante de ce peptide-signal est la suivante :

5'-ATG GCT GTC CTG GTG CTG TTC CTC TGC CTG GTT GCA TTT
CCC AGC TGT GTC CAC TCC-3'

30 Elle est identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 10

Elle a été synthétisée chimiquement sous forme de brins complémentaires, de manière à ce qu'elle puisse être insérée dans un site BglII (figure 3). Les 35 conditions d'appariement et de ligation sont identiques à

celles utilisées pour le clonage de la séquence codante du peptide-signal utilisée pour la chaîne légère.

c- Régions constantes humaines :

- IgG1 (C γ 1)

5 Le cDNA de la séquence codante de la région C γ 1 humaine a été amplifié par PCR en utilisant les amorces suivantes :

*HuC γ 1BAC :

5' CAA GGT ACC ACG GTC ACC GTC TCC - 3'

10 (site KpnI souligné).

Cette amorce correspond à une séquence consensus des régions JH humaines (extrémités 3' des régions variables des chaînes lourdes humaines), et comprend un site KpnI.

15 Elle est identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 11

*HuC γ 1FOR :

5' -GAAGATC TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA G-3'

(site BglII souligné)

20 est identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 12

La séquence a été déterminée à partir de séquences C γ 1 humaines. L'amorce est complémentaire de l'extrémité 3' des C γ 1 humaines, et permet de reconstituer 25 après amplification un site BglII en aval du codon stop.

La matrice utilisée pour amplifier la région C γ 1 humaine est le même mélange d'ADNc que celui utilisé pour l'amplification des séquences codantes C κ et C λ .

Le produit d'amplification a été séquencé et 30 cloné dans le vecteur de transfert pGm16 portant la séquence codant pour le peptide-signal. La construction obtenue a été appelée pBC γ 1 (figure 3).

Pour l'amplification des régions constantes 35 des immunoglobulines IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM et IgA, on utilise comme amorce 5' l'amorce HuC γ 1BAC ci-dessus associée respectivement aux amorces 3' suivantes :

- IgG2 :

HuC γ 1FOR,

- IgG3 :

HuC γ 1FOR,

5 - IgG4 :

HuC γ 1FOR,

- IgE :

5' - GAAGATC TCATTT ACC GGG ATT TAC AGA- 3',

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le
10 numéro SEQ ID NO : 13

- IgM :

5' -GAAGATC TCA TTT ACC GGT GGA CTT GTC GTC-3',

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le
numéro SEQ ID NO : 14

15 - IgA :

5-GAAGATCTCA GTA GCA GGT GCC GTC CAC CTC-3',

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le
numéro SEQ ID NO : 15.

Pour les régions constantes des IgG1, 2, 3 et
20 4, la même amorce est utilisée en 3' en raison de la
grande conservation de séquences entre les différentes
sous-classes dans cette partie. Pour les amorces
utilisées pour les IgE, les IgM et les IgA, les sites de
coupure BglII introduits sont soulignés.

25 **Exemple 4 - Expression d'un anticorps chimère
(souris-Homme) dans des cellules d'insecte infectées par
un vecteur conforme à l'invention :**

Le MAb K20 est un anticorps murin produit par
un hybridome. Il est dirigé contre la sous-unité β des
30 récepteurs CD29 des lymphocytes [BOUMSELL et al., J. Exp.
Med. 152, p. 229 (1980)]. Un baculovirus recombinant
conforme à l'invention a été utilisé pour exprimer un
anticorps K20 chimère ayant les régions variables du K20
d'origine et les régions constantes humaines provenant
35 des cassettes pBCk et pBC γ 1.

1. Clonage de la région variable de la chaîne légère κ de K20 :

L'ARN total de l'hybridome a été extrait à l'aide du kit "RNA extraction Kit" de PHARMACIA, et une transcription inverse a été réalisée en utilisant l'amorce VKFOR (First-Strand cDNA Synthesis kit ; PHARMACIA) :

*VKFOR :

5' - CCG TTT GAT CTC GAG CTT GGT CCC 3'

10 (site Xhol souligné)

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 16

Cette amorce est complémentaire de la séquence consensus à l'extrémité 3' de la région variable Vκ des gènes murins. Elle est destinée à amplifier les Vκ réarrangées avec les jonctions Jκ1 ou Jκ2 (qui sont les plus répandues), mais également celles réarrangées avec les jonctions Jκ4 ou Jκ5.

Le cDNA a été amplifié par PCR en utilisant d'une part l'amorce VKFOR et d'autre part l'amorce VK2BAC:

*VK2BAC :

5' - GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA -3'

(site SacI souligné)

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO : 17.

La séquence de cette amorce est identique à une séquence précédemment publiée [WINTER et CLACKSON, Nature, 352, p 624, (1991)]. VK2BAC est capable d'amplifier les régions variables murines Vκ3, Vκ4 et Vκ6.

Après amplification de la région VκK20, une digestion SacI-Xhol du produit d'amplification a été réalisée et le fragment obtenu a été cloné entre les sites SacI et Xhol du plasmide chaîne légère pBCK pour donner le plasmide pBVKK20HuCK (figure 4A).

2- Clonage de la région variable de la chaîne lourde γ1 de K20 :

La transcription inverse sur l'ARN total extrait de l'hybridome producteur de K20 a été réalisée en utilisant l'amorce VHFOR. Cette même amorce, et l'amorce VH1BAC ont par la suite servi à amplifier la 5 région VH à partir de l'ADNc :

*VHFOR :

5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT aCC TTG GC-3'

(Site KpnI souligné).

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le 10 numéro SEQ ID NO : 18

*VH1BAC :

5'-AG GT(C/G) (A/C)A(A/G) CTG CAG (C/G) AG TC(A/T) GG-3'

(Site PstI souligné)

identifiée dans la liste des séquences en annexe sous le 15 numéro SEQ ID NO : 19.

VHFOR est identique à une amorce décrite par ORLANDI et al. (1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833-3837), la seule différence se situant au niveau du "a" qui remplace un "C" (cf. site KpnI souligné ci-dessus). 20

Après amplification et digestion par PstI et KpnI, la région VH de K20 a été insérée dans le plasmide chaîne lourde au niveau des sites PstI-KpnI. Le plasmide chargé a été appelé pBVHK20HUC γ 1 (figure 4B).

25 3- Construction d'un virus recombinant produisant le K20 chimère (figure 5):

a- Insertion de la chaîne lourde :

Le plasmide chargé pBVHK20HUC γ 1 a été utilisé en cotransfection avec l'ADN d'un baculovirus modifié 30 appelé AcSLp10 [CHAABIHI et al., J. Virol., 67, 2664-2671 (1993)], qui est dépourvu du gène polyédrine (promoteur+séquence codante), mais porte la séquence codante de la polyédrine sous contrôle du promoteur P10, dans le locus naturel P10. Ce virus produisant des 35 polyédres dans les cellules infectées, la recombinaison au niveau du locus P10 peut ainsi être facilement

déTECTée. Les conditions de cotransfection sont les suivantes : 500 ng d'ADN viral sont mélangés avec 5 µg d'ADN plasmidique et 40 µl de solution DOTAP (BOEHRINGER) dans 3 ml de milieu de culture sans sérum pour cellules d'insectes. Ce mélange est utilisé pour recouvrir 4×10^6 cellules Sf9 (ATCC35CRL 1711) ; après 4 heures de contact, le mélange de cotransfection est remplacé par 4 ml de milieu complet et l'incubation est faite à 27°C pendant 5 jours.

A la suite de la cotransfection, le virus produisant la chaîne lourde de l'anticorps K20 chimère sous le contrôle du promoteur P10 a été purifié par la technique des plages de lyse. Ce virus a été appelé AcSLp10-K20H.

b- Insertion de la chaîne légère :

Le plasmide chargé pBVKK20HUCK a été utilisé en cotransfection avec l'ADN du baculovirus modifié AcSLp10-K20H.

Les doubles recombinants ont été sélectionnés par la technique de la dilution limite, associée à l'ELISA et/ou à l'hybridation moléculaire.

Après la cotransfection, on effectue une gamme de dilutions du surnageant infectieux, et chaque dilution est utilisée pour l'infection de cellules d'insectes. Trois jours après l'infection, les surnageants sont testés en ELISA pour rechercher la présence d'anticorps de type humain correctement assemblés. Les surnageants des puits les plus positifs pour les dilutions les plus importantes sont à leur tour dilués et utilisés pour infecter d'autres cultures ; après quelques cycles dilution/infection, les surnageants enrichis en baculovirus produisant l'anticorps entier sont étalés sur un tapis cellulaire, et clonés par la méthode des plages de lyse.

Exemple 5 - Production et purification de l'anticorps K20 :

Le virus double-recombinant a été amplifié par une série de passages sur des cellules d'insecte en culture. Le stock viral a été ensuite utilisé pour infecter une culture agitée en spinner (500 ml de culture à 10⁶ cellules par ml).

Après 72 heures d'infection, la culture est récoltée et centrifugée à 1000 g pour clarifier le surnageant. Ce dernier a été concentré jusqu'au 1/3 de son volume initial par centrifugation à travers une membrane ayant un seuil de coupure de 30 kDa (CENTRIPEP 30, Amicon) (1ère centrifugation : 1000g, 20°C, 30 minutes ; élimination du filtrat ; 2ème centrifugation : 1000g, 20°C, 20 minutes).

La solution a été équilibrée dans un tampon de fixation sur protéine A, par dilution dans ce tampon suivie d'une nouvelle concentration par centrifugation (tampon de dilution : Glycine 1,5M, NaCl 3M; pH 8,9). La solution équilibrée est ensuite passée dans une colonne de protéine A, elle même équilibrée dans le même tampon que la solution de K20. Après rinçage de la colonne, l'anticorps est élué par un tampon d'élution (Acétate 0,1M, NaCl0,5M; pH3). L'élution est suivie en mesurant la DO à 280 nm. Les fractions contenant l'anticorps ont été mélangées et concentrées par centrifugation à travers une membrane ayant un seuil de coupure de 10 kDa (CENTRIPEP 10, AMICON). La solution concentrée est diluée avec du PBS puis reconcentrée de la même manière. La solution d'anticorps obtenue est conservée à +4°C dans le PBS (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 4,3 mM Na₂HPO₄-7H₂O; 1,4 mM KH₂PO₄).

La qualité de l'anticorps a été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, en utilisant comme témoin une IgG1 humaine du commerce (SIGMA). Cette expérience a montré que l'anticorps chimère non-réduit (ponts disulfure intacts) migre au même niveau que l'anticorps humain témoin.

Après traitement par le dithiotréitol (DTT), on observe l'apparition de deux bandes correspondant aux chaînes lourdes et légères, et migrant au même niveau que les chaînes de l'anticorps humain témoin également réduit au DTT.

Pour confirmer les résultats précédents, les protéines des fractions comprenant l'anticorps ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose, et les chaînes H et L ont été détectées par des anticorps spécifiques des régions Cyl et CK humaines.

Cette expérience démontre que l'anticorps produit par les cellules d'insectes est bien constitué de chaînes H et L, et que les parties constantes de ces chaînes sont reconnues par des anticorps spécifiques.

Exemple 6 - Test de l'activité et de la spécificité du K20 produit par les cellules d'insectes :

L'anticorps monoclonal K20 est dirigé contre la sous unité $\beta 1$ des intégrines humaines (récepteur CD29) localisée à la surface des lymphocytes. La fixation de K20 sur la molécule CD29 inhibe la prolifération des lymphocytes T4 humains activés [GROUX et al., Nature, 339, 152-154, (1989)]. L'effet suppressif de K20 sur la prolifération cellulaire T permet d'envisager l'utilisation de cet anticorps dans la prévention des rejets de greffes. Pour tester l'activité de l'anticorps K20 chimérique produit conformément à l'invention, deux types d'expériences ont été réalisés : l'immunofluorescence et l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T. Les protocoles expérimentaux suivis ont pour l'essentiel été précédemment décrits [GROUX et al. Nature 339, 152-154 (1989); TICCHIONI et al. Journal of Immunology 151, 119-127 (1993)].

1- Expériences d'immunofluorescence :

Des lymphocytes humains portant le récepteur CD29 ont été fixés sur lame de verre puis incubés en

présence du K20 chimérique produit conformément à l'Invention, du K20 murin d'origine, ou du tampon seul.

Après une série de rinçages, on rajoute ou bien un anticorps secondaire fluorescent spécifique du K20 chimérique produit conformément à l'Invention, ou bien un anticorps secondaire fluorescent spécifique du K20 murin d'origine.

Après un nouveau rinçage, les préparations ont été observées au microscope pour visualiser la fluorescence. Ceci a montré que le K20 chimérique produit conformément à l'Invention se fixe de manière spécifique sur les lymphocytes portant le CD29, tout comme le témoin positif K20 murin d'origine ; aucune fluorescence n'a été détectée en l'absence des anticorps K20.

2- Inhibition de la prolifération des lymphocytes CD4⁺ par K20 :

Des lymphocytes humains CD4⁺ ont été activés par un anticorps anti-CD3 en présence d'interleukine-2. Les anticorps K20 chimérique conforme à l'Invention, ou K20 murin d'origine ont été rajoutés (20 µg/ml) pour vérifier leur effet sur la prolifération lymphocytaire. Une expérience avec un anticorps non-inhibiteur [GROUX et al. Nature, 339, p 152, (1989)] a été réalisée pour servir de témoin négatif.

La prolifération est mesurée en comptant la quantité de thymidine ³H incorporée après 4 jours de culture suite aux traitements par les anticorps. On observe 50 à 70% d'inhibition de la prolifération quand les cellules ont été incubées avec l'anticorps K20 produit conformément à l'Invention.

L'anticorps K20 murin d'origine (témoin positif) inhibe également la prolifération des lymphocytes activés dans les mêmes proportions : 50 à 70%.

Exemple 7 - Comparaison de l'efficacité du promoteur Syn et du promoteur polyédrine :

Deux virus double-recombinants ont été construits selon le protocole décrit dans les exemples 1 à 4 ci-dessus :

- dans l'un d'entre eux (virus 1) la chaîne lourde est sous contrôle du promoteur P10, et la chaîne légère est sous contrôle du promoteur polyédrine ;
- dans l'autre, (virus 2) la chaîne lourde est sous contrôle du promoteur P10, et la chaîne légère est sous contrôle du promoteur Syn.

La quantité d'anticorps sécrétée par des cellules infectées par l'un ou l'autre de ces deux virus est déterminée comme décrit à l'exemple 5.

Les résultats sont illustrés par le Tableau I ci-dessous, qui indique la quantité d'anticorps sécrétés (en µg/ml) à différentes périodes après l'infection (p.i.) :

TABLEAU I

Virus	12 h p.i.	24 h p.i.	48h p.i.
1	0,31	0,96	8,9
2	1,24	2,72	9,9

Ces résultats montrent que la sécrétion d'anticorps est plus précoce et plus importante lorsque le promoteur Syn est utilisé.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: PROTEINE PERFORMANCE (SOCIETE ANONYME)
(B) RUE: ROUTE D'ALES
(C) VILLE: SAINT-CHRISTOL-LES-ALES
(D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 30380

(A) NOM: CERUITI MARTINE
(B) RUE: 2997, ROUTE DE MONTEZE
(C) VILLE: SAINT CHRISTOL-LES-ALES
(D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 30380

(A) NOM: CHAABIHI HASSAN
(B) RUE: 30B, AVENUE JULES GUESDE
(C) VILLE: ALES
(D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 30100

(A) NOM: DEVAUCHELLE GERARD
(B) RUE: 137, CHEMIN DE L'ESPERVETTE
(C) VILLE: SAINT CHRISTOL-LES-ALES
(D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 30380

(A) NOM: GAUTHIER LAURENT
(B) RUE: 186, GRANDE RUE
(C) VILLE: ALES
(D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 30100

(A) NOM: KACZOREK MICHEL
(B) RUE: 81, BOULEVARD DE LA LIRONDE
(C) VILLE: MONTFERRIER
(D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 34980

(A) NOM: LEFRANC MARIE-PAULE
(B) RUE: 4, RUE DU VALLON
(C) VILLE: CLAPIERS
(D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 34830

(A) NOM: POUL MARIE-ALIX
(B) RUE: 10, RUE DE DOCTEUR ROUX
(C) VILLE: MONTPELLIER
(D) ETAT OU PROVINCE: FRANCE
(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 34000

(ii) TITRE DE L' INVENTION: BACULOVIRUS RECOMBINANT ET SON UTILISATION POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 19

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 76 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATCAAATAAA TAAGTATTTT AAAGAATTG TACGTATTTT GTATATTAAT TAAAATACTA	60
TACTGTAAAT AGATCG	76

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 80 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

TAGTTTATT ATTCAAAAAA TTTCITAAGC ATGCATAAAA CATATAATTA ATTATATGAT	60
ATGACATTAA TCTAGCCTAG	80

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 57 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGAACAG CTACAGGTGT CCACTCC

57

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

AGCTCGAGAT CAAACGG

17

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GAAGATCTAA CACTCTCCGC GGTTGAAG

28

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CCTGTAGAT CTATGAAACAT TCTGTAGGGG

30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CCGCCCTCCC TCGAGCTTCA A

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CASTCTGAGC TCACKCAG

18

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

TTGAAGCTCC TCGAGGGAGG GCGGGAA

27

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 57 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

ATGGCTGTCC TGGTGCTGTT CCTCTGCCTG GTTGCATTTC CCAGCTGTGT CCACCTCC

57

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CAAGGTACCA CGGTACCGT CTCC

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GAAGATCTCA TTTACCCGGA GACAGGGAG

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GAAGATCTCA TTTACCGGGA TTTACAGA

28

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GAAGATCTCA TTTACCGGTG GACTTGTGTCGT C

31

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

GAAGATCTCA GTAGCAGGTG CCGTCCACCT C

31

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

CCGTTTGATC TCGAGCTTGG TCCC

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide

- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

GACATTGAGC TCACCCAGTC TCCA

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

TGAGGAGACG GTGACCGTGG TACCTTGGC

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

AGGTSAAMCT GCAGRAGTCW GG

22

REVENDICATIONS

- 5 1) Baculovirus recombinant, constituant un vecteur d'expression utilisable pour la production d'immunoglobulines dans une cellule d'insecte, et caractérisé en ce qu'il comprend :
- 10 - une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne H d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur de baculovirus,
- 15 - une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne L d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur de baculovirus;
- 20 le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents, et étant situés dans deux locus différents.
- 25 2) Baculovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'un des promoteurs est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la polyédrine et l'autre est situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la P10.
- 30 3) Baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les deux promoteurs sont des promoteurs forts.
- 35 4) Baculovirus recombinant selon la revendication 3, caractérisé en ce que au moins l'un des promoteurs est choisi dans le groupe constitué par :
- le promoteur P10 ;
 - le promoteur polyédrine ;
 - un promoteur synthétique, dénommé promoteur Syn, et constitué par un fragment d'ADN double-brin dont

la séquence, représentée dans la liste de séquence en annexe sous les numéros SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO: 2, est la suivante :

5 5-
ATCAAATAAATAAGTATTAAAGAATTCTGTAOGTATTGTATATTAAATTAAAACACTATACTGTAAATAGATCG
TAGTTTATTATTCTATAAAATTCTAACATGCATAAAACATATAATTAAATTATGATATGACATTATCTAGCTAG
3 -3
5

10 5) Baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que chaque cassette d'expression comprend : (i) un promoteur fort de baculovirus, et sous contrôle dudit promoteur : (ii) une séquence codant pour un peptide-signal ; (iii) une séquence codant pour un domaine variable d'immunoglobuline ; (iv) une séquence codant pour un domaine constant d'une chaîne H ou L d'immunoglobuline.

15 6) Baculovirus recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce que la séquence codant pour un peptide-signal placée sous contrôle du premier promoteur, est différente de la séquence codant pour un peptide-signal placée sous contrôle du second promoteur.

20 7) Baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce qu'au moins une des séquences codant pour un peptide-signal code pour un peptide qui posséde une séquence His-Val-Ser immédiatement en amont du site de coupure utilisé par la signal-peptidase.

25 8) Baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que la séquence codant pour le domaine constant d'immunoglobuline est une séquence d'origine humaine.

30 9) Cellule d'insecte, infectée par un baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 à 8.

35 10) Procédé de préparation d'une immunoglobuline, caractérisé en ce que l'on met en culture des cellules d'insecte, selon la revendication 9

et en ce que l'on extrait ladite immunoglobuline à partir du milieu de culture.

11) Immunoglobuline, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 10.

12) Procédé de préparation d'un baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 à 8, lequel procédé est caractérisé en ce que :

10 - l'on prépare un premier plasmide de transfert contenant comprenant une séquence codant pour au moins une partie de chaîne H d'immunoglobuline, sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur fort d'un baculovirus ;

15 - l'on prépare un second plasmide de transfert comprenant la séquence codant pour au moins une partie de chaîne L d'immunoglobuline, sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur fort dudit baculovirus ;

20 le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents ;

- l'on procède à la recombinaison homologue de l'un et de l'autre desdits plasmides avec l'ADN d'un baculovirus ;

25 - après réplication de l'ADN viral dans les cellules transfectées, l'on procède à la sélection des baculovirus recombinants ayant intégré la séquence codant pour au moins une partie de chaîne H et la séquence codant pour au moins une partie de chaîne L d'immunoglobuline.

30 13) Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que chaque plasmide de transfert utilisé porte un insert comprenant :

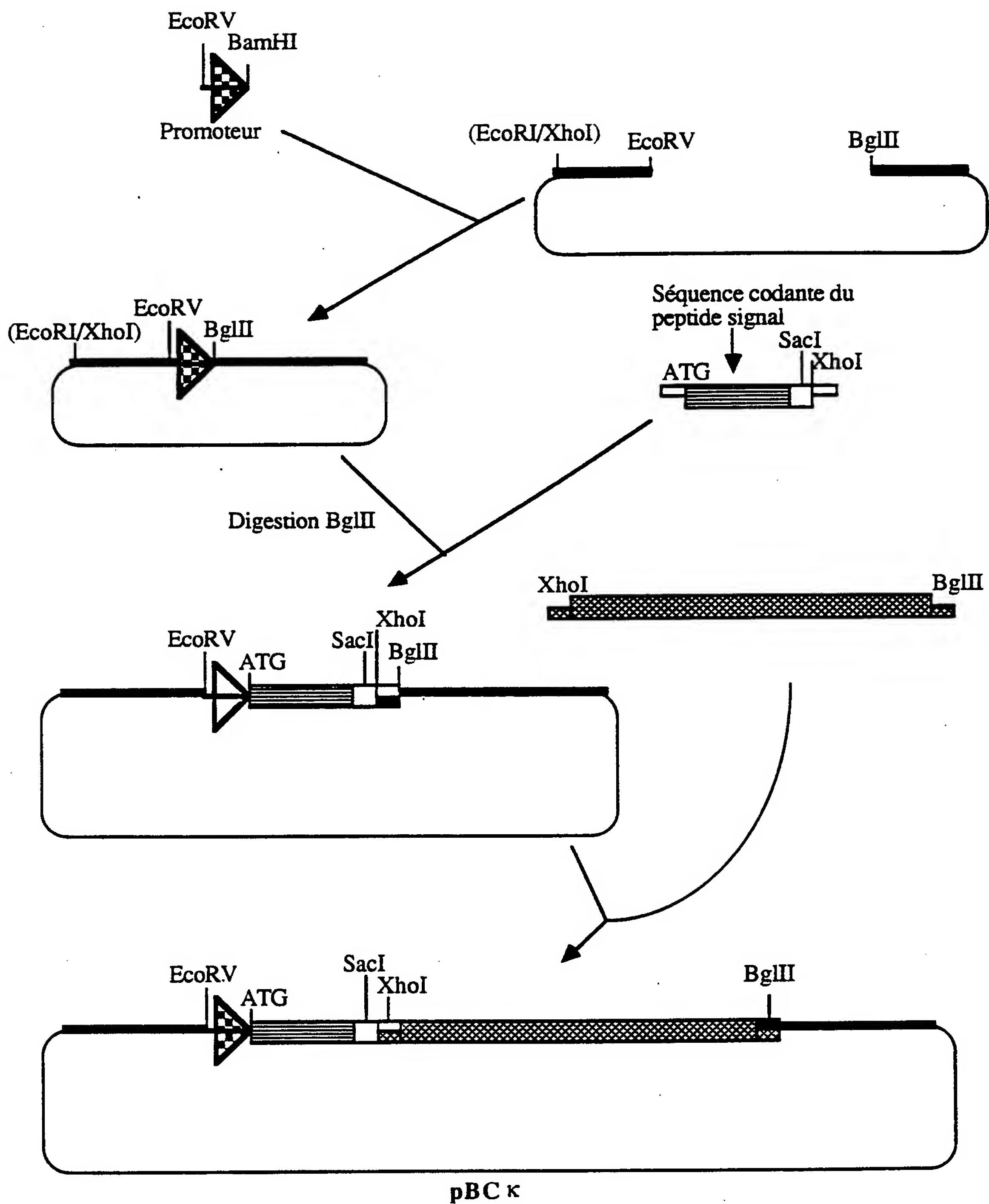
35 - une cassette d'expression telle que définie dans la revendication 5, et de part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant la portion du génome viral

en remplacement de laquelle on souhaite insérer ladite cassette.

14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que lesdites séquences de baculovirus 5 sont homologues de celles des régions flanquant le gène de la p10, ou homologues de celles des régions flanquant le gène de la polyédrine.

15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'ADN de baculovirus avec lequel 10 est effectuée la recombinaison homologue des plasmides de transfert est constitué par l'ADN d'un baculovirus préalablement modifié par insertion de deux sites Bsu36I de part et d'autre de la séquence codant pour la protéine P10 (ces deux sites étant les seuls pour l'enzyme 15 concernée dans le génome dudit baculovirus modifié), et digéré par l'enzyme Bsu36I.

1 / 5

FIGURE 1

2 / 5

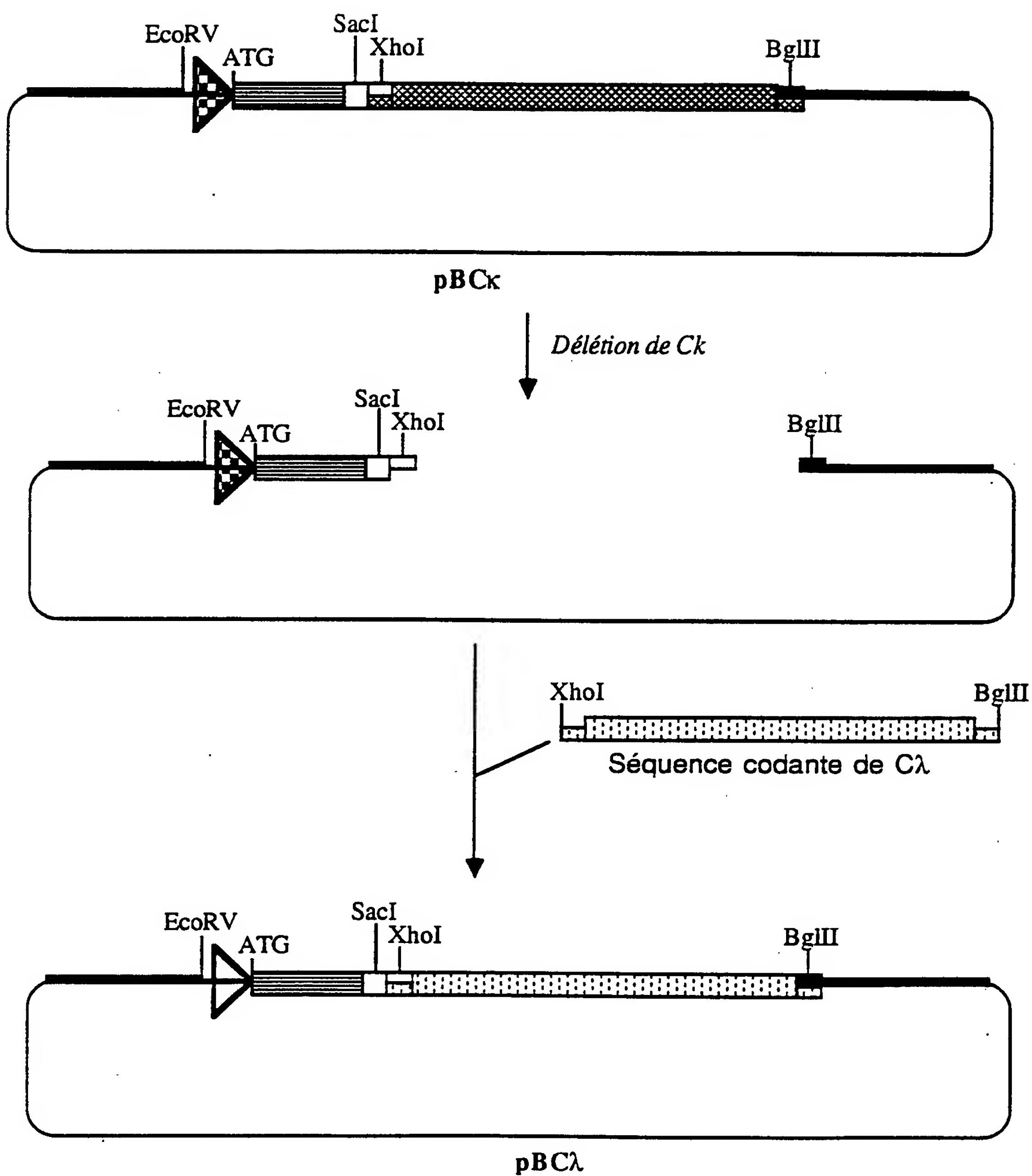
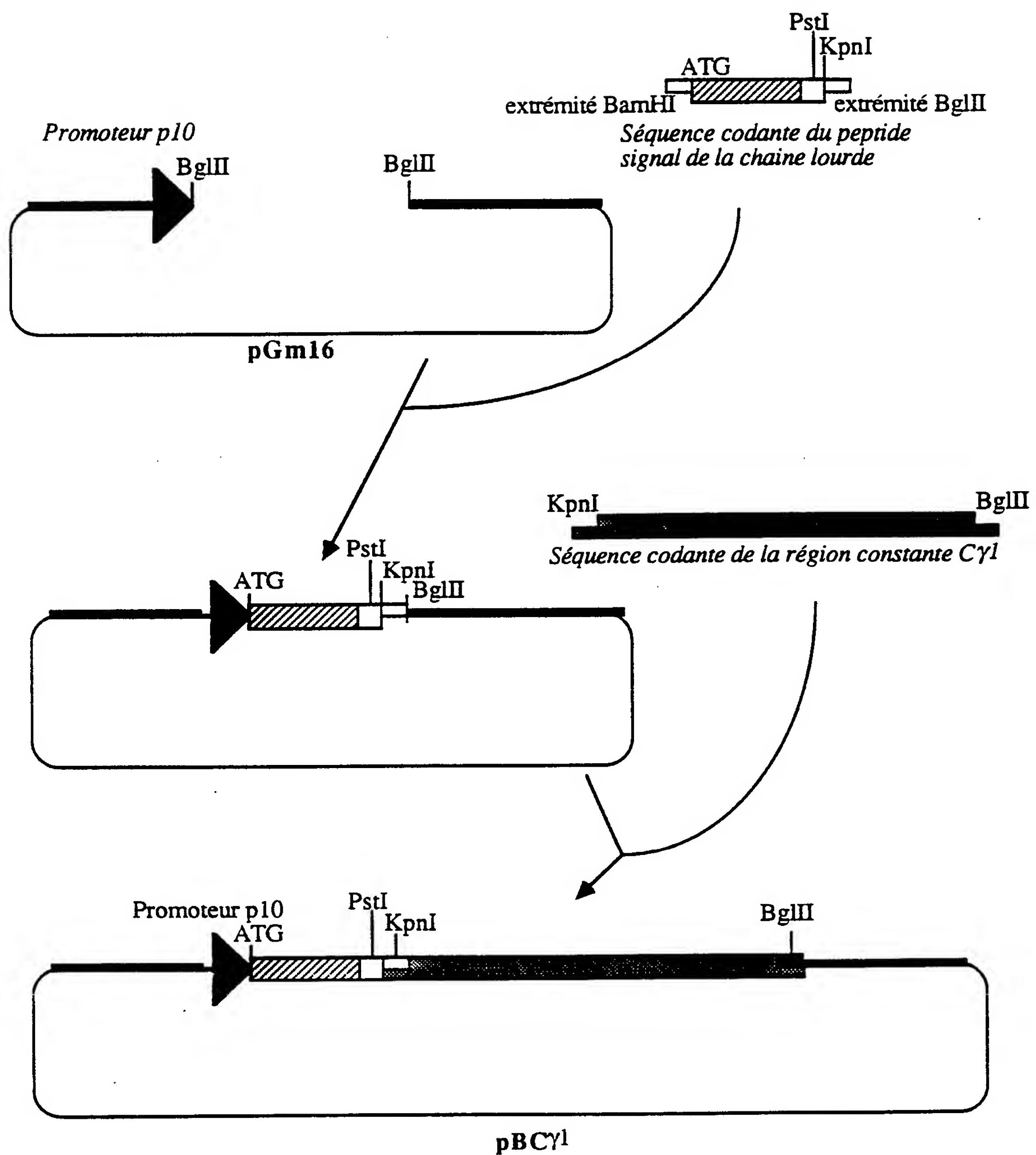


FIGURE 2

3 / 5

FIGURE 3

4 / 5

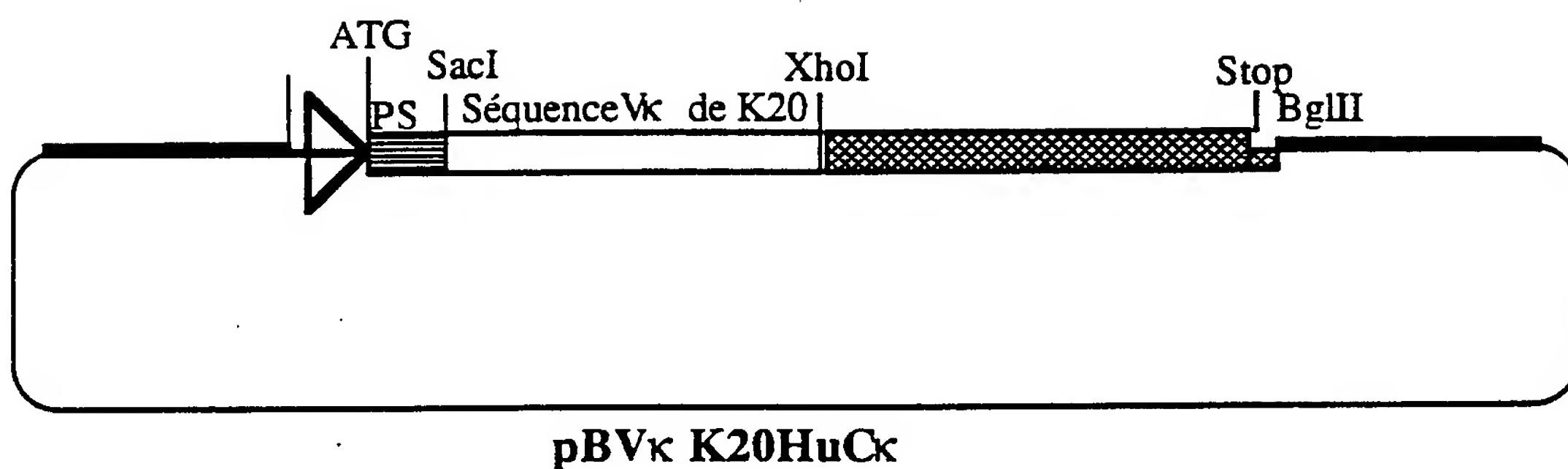
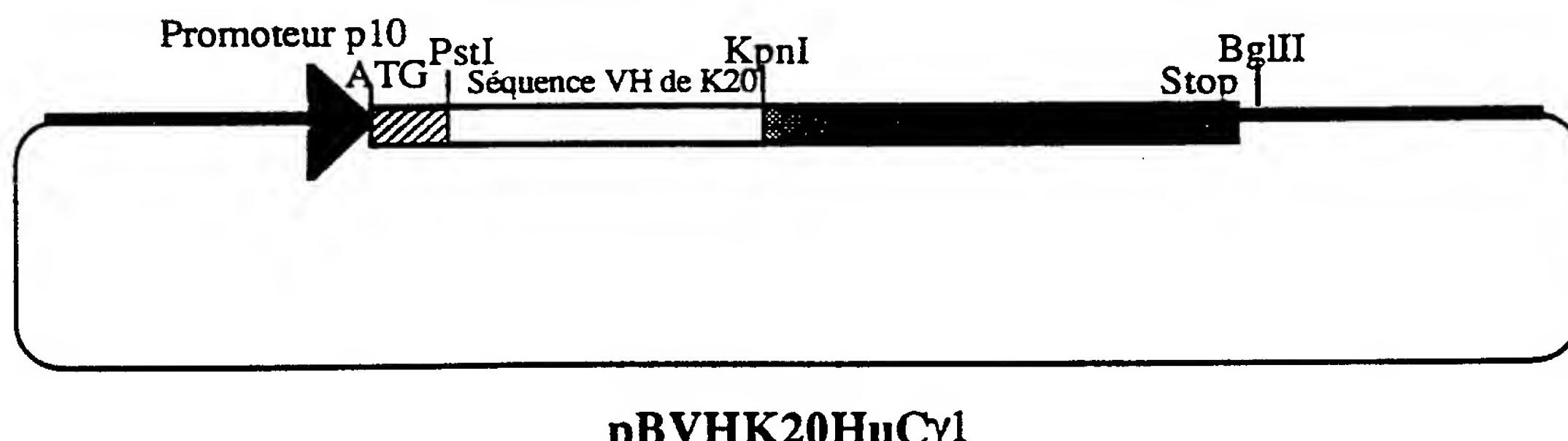
A.**B.**

FIGURE 4

5 / 5

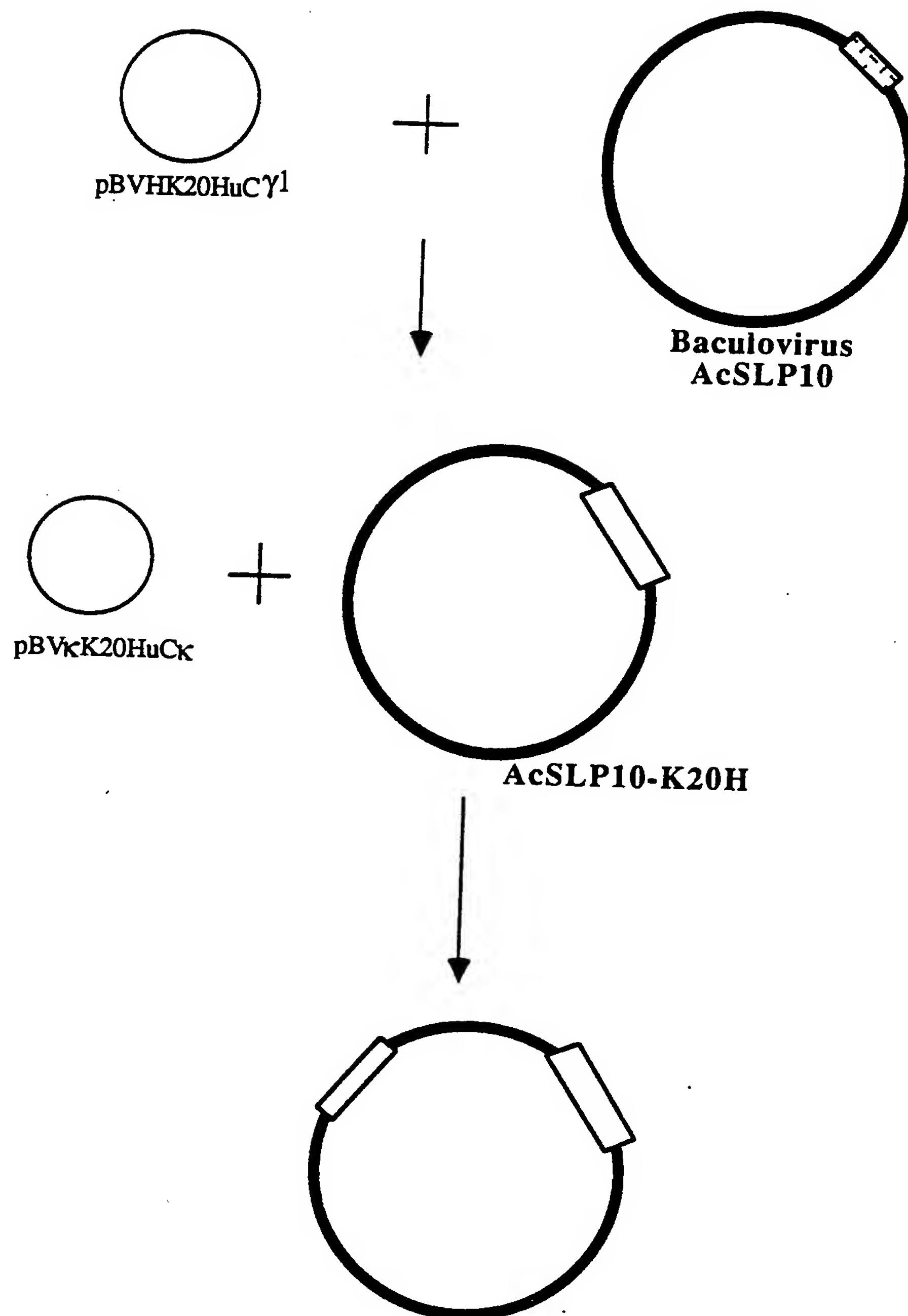


FIGURE 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 95/00110

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 C07K16/28

C12N7/01

C12N5/10

C12N15/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIOTECHNOLOGY, vol.10, August 1992, NEW YORK US pages 910 - 912 REIS, U. ET AL. 'Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus' cited in the application see the whole document ---</p>	1-15
A	<p>BIOTECHNOLOGY, vol.8, July 1990, NEW YORK US pages 651 - 654 ZU PUTLIZ, J. ET AL. 'Antibody production in baculovirus infected insect cells' cited in the application see the whole document ---</p> <p>-/-</p>	1-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 April 1995

Date of mailing of the international search report

02.05.1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 95/00110

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.87, May 1990, WASHINGTON US pages 3942 - 3946 HASEMANN, C. A. & CAPRA, J.D. 'High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system' cited in the application see the whole document ---	1-15
A	WO,A,92 05265 (THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM) 2 April 1992 see the whole document ---	1-15
A	WO,A,92 05264 (THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM) 2 April 1992 see the whole document ---	1-15
A	WO,A,93 09238 (THE UPJOHN COMPANY) 13 May 1993 see the whole document ---	1-15
A	WO,A,90 14428 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION) 29 November 1990 see page 22, line 19 - line 30; claim 11; figure 4; example VI -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. No.

PCT/FR 95/00110

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9205265	02-04-92	US-A-	5162222	10-11-92
		AU-B-	650682	30-06-94
		AU-A-	8655091	15-04-92
		CA-A-	2091887	18-03-92
		EP-A-	0549700	07-07-93
		JP-T-	6502990	07-04-94
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9205264	02-04-92	US-A-	5169784	08-12-92
		AU-A-	8751691	15-04-92
		CA-A-	2091886	18-03-92
		DE-D-	69101713	19-05-94
		DE-T-	69101713	13-10-94
		EP-A-	0549721	07-07-93
		ES-T-	2054508	01-08-94
		JP-T-	6500920	27-01-94
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9309238	13-05-93	AU-A-	2892392	07-06-93
		CA-A-	2120137	13-05-93
		EP-A-	0611397	24-08-94
		JP-T-	6510910	08-12-94
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9014428	29-11-90	AU-B-	631223	19-11-92
		AU-A-	5820790	18-12-90
		CA-A-	2033070	18-11-90
		EP-A-	0426840	15-05-91
		JP-T-	4501065	27-02-92
		US-A-	5244805	14-09-93
-----	-----	-----	-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/00110

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/86 C07K16/28

C12N7/01

C12N5/10

C12N15/13

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistes
A	BIOTECHNOLOGY, vol.10, Août 1992, NEW YORK US pages 910 - 912 REIS, U. ET AL. 'Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-15
A	BIOTECHNOLOGY, vol.8, Juillet 1990, NEW YORK US pages 651 - 654 ZU PUTLIZ, J. ET AL. 'Antibody production in baculovirus infected insect cells' cité dans la demande voir le document en entier --- -/-	1-15

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

- 1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 Avril 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02.05.1995

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 95/00110

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.87, Mai 1990, WASHINGTON US pages 3942 - 3946 HASEMANN, C. A. & CAPRA, J.D. 'High-level production of a functional immunoglobulin heterodimer in a baculovirus expression system' cité dans la demande voir le document en entier ---	1-15
A	WO,A,92 05265 (THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM) 2 Avril 1992 voir le document en entier ---	1-15
A	WO,A,92 05264 (THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM) 2 Avril 1992 voir le document en entier ---	1-15
A	WO,A,93 09238 (THE UPJOHN COMPANY) 13 Mai 1993 voir le document en entier ---	1-15
A	WO,A,90 14428 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION) 29 Novembre 1990 voir page 22, ligne 19 - ligne 30; revendication 11; figure 4; exemple VI -----	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 95/00110

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9205265	02-04-92	US-A- 5162222 AU-B- 650682 AU-A- 8655091 CA-A- 2091887 EP-A- 0549700 JP-T- 6502990		10-11-92 30-06-94 15-04-92 18-03-92 07-07-93 07-04-94
WO-A-9205264	02-04-92	US-A- 5169784 AU-A- 8751691 CA-A- 2091886 DE-D- 69101713 DE-T- 69101713 EP-A- 0549721 ES-T- 2054508 JP-T- 6500920		08-12-92 15-04-92 18-03-92 19-05-94 13-10-94 07-07-93 01-08-94 27-01-94
WO-A-9309238	13-05-93	AU-A- 2892392 CA-A- 2120137 EP-A- 0611397 JP-T- 6510910		07-06-93 13-05-93 24-08-94 08-12-94
WO-A-9014428	29-11-90	AU-B- 631223 AU-A- 5820790 CA-A- 2033070 EP-A- 0426840 JP-T- 4501065 US-A- 5244805		19-11-92 18-12-90 18-11-90 15-05-91 27-02-92 14-09-93